

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 794 763

②① N° d'enregistrement national : 99 07183

⑤① Int Cl⁷ : C 08 L 5/08, A 61 K 9/00, C 12 N 5/00, 11/12, A 61 L 27/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 08.06.99.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 15.12.00 Bulletin 00/50.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement
public à caractère scientifique et technologique — FR.

⑦② Inventeur(s) : DELLACHERIE EDITH, HUBERT
PATRICK, PELLETIER SOPHIE, NETTÉR PATRICK et
PAYAN ELISABETH.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : NONY & ASSOCIES.

⑤④ NOUVEAUX DERIVES DE L'ACIDE HYALURONIQUE, LEUR PREPARATION ET LEUR UTILISATION.

⑤⑦ Composition contenant un hyaluronane modifié constitué essentiellement d'acide hyaluronique, éventuellement réticulé, dans lequel une proportion non supérieure à 50 % des groupes carboxyliques sont sous forme d'esters aliphatiques ou arylaliphatiques dont le groupe aliphatique ou arylaliphatique comporte au moins 10 atomes de carbone. De tels hyaluronanes modifiés, lorsque le taux d'estérification est suffisamment faible, sont solubles dans les milieux aqueux et peuvent alors former des solutions visqueuses ou des hydrogels utilisables notamment en pharmacie et en chirurgie, notamment sous forme d'implants. Lorsque le taux d'estérification est plus élevé, les hyaluronanes modifiés, insolubles, sont utilisables notamment sous forme de microsphères ou d'implants massifs.

FR 2 794 763 - A1



BEST AVAILABLE COPY

L'invention concerne de nouveaux polymères dérivés de l'acide hyaluronique, leur préparation et leur utilisation.

On sait que l'acide hyaluronique est un polysaccharide constitué par la succession de motifs disaccharidiques N-acétylglucosamine/acide glucuronique. L'acide hyaluronique est un polysaccharide naturel dont les solutions aqueuses ont une viscosité élevée. Il est présent notamment dans le cordon ombilical, dans l'humeur vitrée et dans le liquide synovial. Il est également produit par certaines bactéries, notamment par des streptocoques hémolytiques des groupes A et C. La masse moléculaire de l'acide hyaluronique peut varier de 10 000 à 10 000 000 g/mol environ, selon l'origine. L'acide hyaluronique est commercialisé notamment sous la forme de sel de sodium (ou hyaluronate). On utilise le terme générique "hyaluronane" pour désigner indistinctement l'acide hyaluronique et le hyaluronate.

Le hyaluronane est un glycosaminoglycane biorésorbable des tissus conjonctifs. Sa particularité est d'emmagasiner une grande quantité d'eau, formant une matrice visqueuse autour des cellules. En solution à haute concentration, les macromolécules de hyaluronane s'interpénètrent, et cet enchevêtrement confère à la solution des propriétés viscoélastiques (intermédiaires entre les propriétés des solutions visqueuses et les propriétés des solides) qui sont encore renforcées, dans le liquide synovial, par la présence de protéines favorisant la formation de réseaux intermoléculaires. Le hyaluronane donne au liquide synovial le pouvoir d'absorber les chocs : lorsque la force de cisaillement est faible, le liquide synovial a un comportement visqueux. Si la force de cisaillement augmente, son comportement devient plus élastique.

Cependant, le hyaluronane pur, même de haute masse moléculaire et à concentration relativement forte (20 g/l) ne présente pas les propriétés rhéologiques souhaitées pour une utilisation efficace, par exemple, en viscosupplémentation (remplacement du liquide synovial) en viscochirurgie (chirurgie de l'œil) ou pour la réalisation d'implants.

On a maintenant découvert qu'en estérifiant partiellement les groupes carboxyliques du hyaluronane à l'aide de chaînes aliphatiques hydrophobes (notamment chaînes alkyle de longueur suffisante), il est possible d'obtenir, selon le degré d'estérification, des dérivés du hyaluronane présentant des propriétés intéressantes.

Les chaînes aliphatiques hydrophobes sont notamment des chaînes alkyle linéaires ou ramifiées (comportant par exemple un groupe isopropyle en bout de chaîne), pouvant comporter en outre une ou plusieurs insaturations, et comportant au moins 10 atomes de carbone. Dans ce qui suit, on parlera parfois de chaînes "alkyle", mais il faut comprendre que cette expression désigne et englobe des chaînes aliphatiques telles qu'elles viennent d'être définies.

Dans les dérivés de l'invention, le taux d'estérification des groupes carboxyliques est généralement au moins égal à 1 %.

Lorsque le taux d'estérification est inférieur à un certain seuil (qui dépend de la longueur de la chaîne alkyle) les dérivés obtenus sont solubles dans l'eau (ou dans une solution de chlorure de sodium) en donnant des solutions de viscosité plus élevée que le hyaluronane. Lorsque le taux d'estérification est suffisant, ces dérivés solubles sont capables de former, par association des chaînes hydrophobes (réticulation physique), des réseaux intermoléculaires qui confèrent au milieu une viscosité élevée et qui peuvent même conduire à la formation d'hydrogels. La distinction entre "solution visqueuse" et "gel" est fondée sur le critère suivant : placés dans un tube, une solution visqueuse est capable d'écoulement après retournement du tube, contrairement à un gel, qui peut être mou ou dur selon le cas, mais qui ne s'écoule pas.

On peut ainsi obtenir des solutions visqueuses, ou des hydrogels, avec des hyaluronanes modifiés par estérification, jusqu'à un taux d'estérification d'environ 20 % (pour une chaîne alkyle en C_{10}) et d'environ 4 % (pour une chaîne alkyle en C_{18}), et cela avec des concentrations très faibles en hyaluronanes modifiés, par exemple avec des concentrations de l'ordre de 1 %. La réticulation physique peut être renforcée par une réticulation chimique de faible importance conduisant à l'établissement de liaisons covalentes intercaténares, notamment entre des groupes carboxyliques.

On peut ainsi, avec une légère modification chimique du hyaluronane, produire soit des solutions aqueuses à forte viscosité modulable, soit des hydrogels aux propriétés rhéologiques contrôlables, tout en restant dans des domaines de concentration relativement limités. Les produits obtenus conservent une charge négative (groupes carboxyliques résiduels) élevée, ce qui permet d'obtenir des hydrogels capables de fixer des cations et/ou de grands volumes d'eau, et qui sont capables de gonfler dans l'eau lorsqu'ils sont introduits par exemple sous la forme d'une poudre sèche (lyophilisat). Ce gonflement

peut être éventuellement limité par une faible réticulation conduisant à la formation de liaisons intercaténares covalentes.

Les hydrogels de l'invention forment un réseau tridimensionnel de chaînes hydrophiles reliées par des microdomaines hydrophobes constituées par agrégation des chaînes alkyle. Il en résulte une réticulation physique des chaînes hydrophiles. Les microdomaines hydrophobes formés par les agrégats de chaînes hydrophobes sont assimilables à des nanoparticules qui présentent la particularité de ne pas être libres et indépendantes, car elles font partie du réseau tridimensionnel formé par les molécules polymères dans l'hydrogel. Ces sortes de nanoparticules sont capables de solubiliser et donc de retenir des substances hydrophobes, par exemple des médicaments. En outre, le réseau formé par les chaînes polymères permet de retenir des macromolécules hydrophiles ; c'est là une propriété classique des hydrogels.

On peut donc également utiliser les hydrogels par exemple pour l'encapsulation et/ou la vectorisation de principes actifs tels que des macromolécules hydrophiles ou des principes actifs hydrophobes de petite taille. Les hydrogels obtenus peuvent également être utilisés pour favoriser la réparation de tissus vivants lésés, grâce aux possibilités de réhabilitation cellulaire *in vivo* qu'ils autorisent, ou pour l'encapsulation de cellules d'origines diverses, notamment fibroblastes, chondrocytes ou cellules de moelle osseuse, afin de produire par culture *in vitro*, avant réimplantation *in vivo*, un tissu autologue.

Lorsque le degré d'estérification et/ou la longueur des chaînes aliphatiques augmente, les dérivés du hyaluronane de l'invention deviennent très peu solubles ou pratiquement insolubles dans les solutions de chlorure de sodium. De tels produits insolubles peuvent également être utilisés pour former des hydrogels, par addition d'eau à une solution de ces dérivés dans un solvant organique miscible à l'eau.

En outre, les hyaluronanes modifiés de l'invention qui sont insolubles dans l'eau sont utilisables soit sous forme de pièces massives, par exemple en tant que pièces de prothèse osseuse progressivement biodégradables, soit sous forme de microsphères ou de nanosphères permettant notamment la libération progressive de médicaments.

Les hyaluronanes modifiés de l'invention qui sont solubles dans l'eau ont en outre des propriétés émulsionnantes, et ils peuvent être utilisés comme agents émulsionnants dans la préparation de microsphères ou nanosphères, notamment celles constituées à l'aide des dérivés selon l'invention qui sont insolubles.

Les hyaluronanes modifiés de l'invention peuvent être préparés selon les procédés classiques d'estérification, par exemple en faisant réagir un dérivé aliphatique tel qu'un alcanol, un alcanethiol, un monohalogénoalcane, un époxyalcane ou un tosylate, mésylate ou trésylate d'alkyle sur un hyaluronane dont les fonctions carboxyliques sont éventuellement convenablement fonctionnalisées (par exemple sous forme d'ester de N-hydroxysuccinimide ou sous forme de sel de tétraalkylammonium).

De façon analogue, pour l'étape facultative de réticulation, on peut utiliser des réticulants classiques bifonctionnels capables de réagir sur des groupements carboxyliques convenablement fonctionnalisés. Les agents réticulants sont notamment des dérivés dihalogénés, des diols, des dithiols, des diépoxydes ou des ditosylates, dimésylates ou di-trésylates dérivés de chaînes alkyle éventuellement interrompues par un ou plusieurs hétéroatomes (tels que -O-, -S-, -S-S-), par exemple des chaînes polyalkylèneglycol.

Les hyaluronanes modifiés de l'invention ont une masse moléculaire qui dépend essentiellement de la masse moléculaire du hyaluronane de départ. Les réactions d'estérification peuvent entraîner une légère dépolymérisation. Généralement, la masse moléculaire des hyaluronanes modifiés est dans la gamme de 5 000 à 8 000 000 g/mol, lorsqu'elle est mesurée par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un photodiffusiomètre laser (méthode dite SEC-MALLS : Size Exclusion Chromatography - Multian-gle Laser Light Scattering). La viscosité des hyaluronanes modifiés solubles dans l'eau augmente avec leur masse moléculaire.

Les hyaluronanes modifiés de l'invention sont stables en milieu salin 0,15 M NaCl, au moins pendant 1 an à 4°C. A 37°C les fonctions ester s'hydrolysent partiellement et le polymère se dégrade : ainsi, la viscosité au plateau newtonien d'une solution à 1,5 % d'un dérivé contenant des chaînes en C₁₈ (4 % de groupes carboxyliques estérifiés) est divisée par 2 environ au bout de 2 mois. Les hyaluronanes modifiés de l'invention constituent donc des produits progressivement biodégradables. Ils sont en outre biorésorbables et sont bien tolérés par l'organisme. En raison de leur biocompatibilité élevée, on peut les utiliser notamment dans un grand nombre d'applications biomédicales.

L'invention a donc pour objet une composition contenant un hyaluronane modifié constitué essentiellement d'acide hyaluronique, éventuellement sous forme salifiée, dans lequel une proportion non supérieure à 50 % des groupes carboxyliques sont sous forme d'esters aliphatiques ou arylaliphatiques dont le groupe aliphatique ou arylaliphati-

que possède au moins 10 atomes de carbone. Les chaînes aliphatiques ou arylaliphatiques sont en particulier celles ayant de 10 à 22 atomes de carbone, et notamment celles ayant de 12 à 18 atomes de carbone. Les chaînes arylaliphatiques sont notamment des chaînes aralkyle et en particulier des chaînes phénylalkyle.

5 Le terme "composition" désigne ici non seulement toute combinaison de l'acide hyaluronique modifié avec un autre ingrédient, par exemple de l'eau pour former un hydrogel (ou un hydrogel contenant des substances hydrophobes, des macromolécules hydrophiles ou des cellules), mais aussi l'acide hyaluronique modifié seul, par exemple sous forme de poudre lyophilisée, de film ou de pièce massive.

10 Dans la composition de l'invention, le hyaluronane modifié peut être en outre réticulé, notamment par des ponts alkylène éventuellement interrompus par un ou plusieurs hétéroatomes, notamment d'oxygène ou de soufre.

Parmi les compositions de l'invention, on peut distinguer celles contenant un hyaluronane modifié dont la proportion de groupes carboxyliques estérifiés par des chaînes alkyle est suffisamment faible, et/ou celles pour lesquelles la réticulation éventuelle a
15 été effectuée à un taux suffisamment faible, pour que le hyaluronane modifié résultant soit soluble dans une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M. De telles compositions peuvent se présenter sous la forme de solutions aqueuses visqueuses ou sous la forme d'hydrogels contenant éventuellement une substance hydrophobe et/ou une substance macromoléculaire hydrophile, ou encore des cellules vivantes. La composition peut
20 également se présenter sous la forme d'un lyophilisat, et en particulier d'un lyophilisat obtenu par lyophilisation d'un hydrogel tel qu'il vient d'être défini.

Lorsqu'on utilise un hyaluronane modifié réticulé, dans le but d'obtenir un hydrogel à résistance mécanique améliorée, on effectue de préférence la réticulation avec
25 un taux suffisamment faible pour que le polymère puisse former un hydrogel capable de retenir une masse d'eau au moins égale à 50 % de la masse du polymère. Ce taux de réticulation peut être facilement déterminé, dans chaque cas, par de simples expériences de routine.

L'un des buts recherchés par les auteurs de la présente invention est l'obtention d'un matériau se présentant sous forme d'un hydrogel biocompatible et biorésorbable
30 apte à être utilisé pour assurer et améliorer la réparation de certains tissus vivants lésés (peau ou cartilage par exemple), y compris des tissus ayant subi des lésions pathologiques

ou des pertes de matière, cette utilisation pouvant être faite soit *in vivo*, par implantation suivie d'une réhabilitation cellulaire, soit *ex vivo*. Dans ce dernier cas, l'hydrogel sert de support pour la culture de cellules, ce support favorisant la néosynthèse *in vitro* d'une matrice extracellulaire. L'hydrogel obtenu après culture peut ensuite être réimplanté chez le donneur des cellules.

On peut aussi employer ces hydrogels dans des domaines très variés (traumatismes, chirurgie esthétique), par exemple dans le traitement des lésions ostéocondrales traumatiques par comblement. On peut également effectuer une application directe de l'hydrogel sur un tissu lésé pour en activer la cicatrisation ou pour favoriser la régénération cellulaire des tissus ayant perdu leur élasticité et/ou leur résistance.

Les hydrogels de l'invention peuvent encore être utilisés notamment comme compositions pharmaceutiques permettant notamment de libérer progressivement les médicaments qu'elles renferment. De telles compositions s'avèrent particulièrement intéressantes dans le cas de principes actifs réputés insolubles dans l'eau. Les compositions de l'invention peuvent également être utilisées pour libérer progressivement des principes actifs hydrophiles, et en particulier des macromolécules hydrophiles, par exemple des facteurs de croissance.

On peut aussi incorporer dans les hydrogels de l'invention des macromolécules immunogènes (notamment des protéines ou des conjugués protéine-antigène, par exemple des conjugués antigène-anatoxine tétanique, obtenus de façon connue en soi) et éventuellement des adjuvants. Les gels obtenus sont alors utilisables comme agents vaccinaux présentant l'avantage que, du fait de la libération progressive de l'immunogène, l'organisme se trouve plus longtemps au contact de celui-ci.

Les compositions pharmaceutiques à base d'hydrogels de l'invention sont utilisables dans des procédés de traitement thérapeutique comprenant leur administration notamment par voie orale ou rectale, ou par implantation. L'hydrogel, ou le lyophilisat correspondant, peut être encapsulé dans un matériau capable de se désagréger par fusion, ramollissement ou dissolution au contact du corps ou des fluides corporels. Les compositions sous forme d'implants peuvent être mises en place, notamment par injection. En effet, les hydrogels obtenus selon l'invention possèdent généralement des propriétés de rhéofluidification, c'est-à-dire que leur viscosité diminue lorsqu'après une période de repos, une contrainte suffisante est brusquement appliquée puis maintenue constante. Les

hydrogels ayant cette propriété sont capables de transiter à travers une aiguille creuse ayant par exemple 2 mm ou même 1 mm de diamètre intérieur, ce qui permet de réaliser des implantations par injection. Les implants ainsi injectés retrouvent leur viscosité d'origine, et donc leur comportement de gel, après un temps pouvant aller généralement de quelques dizaines à quelques centaines de secondes. Cela permet à l'implant de rester en place là où il a été introduit.

Les hydrogels de l'invention peuvent également servir de supports implantables et biorésorbables destinés à favoriser la régénération tissulaire, par exemple la régénération de tissus osseux ou de cartilage (éventuellement avec des hydrogels chargés de cellules autologues et/ou de facteurs de croissance), ou encore la régénération du parodonte selon la technique de la régénération tissulaire guidée.

On peut également incorporer dans les hydrogels de l'invention des substances colorantes, des substances aromatiques, des insecticides, etc. De tels hydrogels peuvent être utilisés notamment comme supports pour la diffusion prolongée de parfums, d'arômes, d'insecticides, etc.

Parmi les hyaluronanes modifiés de l'invention, on peut mentionner également ceux dans lesquels la proportion de groupes carboxyliques estérifiés et/ou le taux de réticulation sont suffisamment élevés pour que le polymère résultant soit pratiquement insoluble dans une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M. Parmi ces polymères, ceux dont la proportion de groupes carboxyliques estérifiés n'est pas trop élevée peuvent gonfler progressivement dans l'eau en formant des hydrogels. Les polymères insolubles dans l'eau peuvent également former des hydrogels par dissolution du polymère dans un solvant organique miscible à l'eau (par exemple le DMSO), suivie d'addition d'eau à cette solution. Lorsque le taux d'estérification devient suffisamment élevé, les polymères insolubles ne gonflent pas dans l'eau.

La composition de l'invention, lorsqu'elle contient des hyaluronanes modifiés insolubles dans l'eau, peut se présenter sous la forme de microsphères. On entend ici par "microsphère" un système sphérique plein dont le diamètre moyen n'excède pas quelques centaines de micromètres (en particulier 500 μm), cette notion englobant des sphères (appelées nanosphères) de diamètre moyen inférieur au micromètre.

De telles microsphères constituent des systèmes biorésorbables permettant de libérer progressivement certains principes actifs. Elles peuvent être administrées par voie

orale, intramusculaire ou intraveineuse, selon leur diamètre. L'un des avantages des microsphères est qu'elles permettent d'administrer facilement par injection des principes actifs ayant une durée d'action prolongée grâce à leur libération progressive, ce qui améliore l'action thérapeutique des principes actifs et réduit leur toxicité éventuelle. Cette méthode évite la mise en place d'implants et évite aussi les administrations répétées puisque l'action du principe actif se fait sur une durée plus longue.

Les microsphères peuvent être obtenues par diverses techniques connues en soi, notamment de la façon suivante : le polymère (insoluble dans l'eau) qui constitue les microsphères est dissous dans un solvant (tel que le DMSO) miscible à l'eau. La solution résultante est précipitée dans l'eau en présence de tensioactifs en agitant. La taille des particules obtenues peut être contrôlée notamment par la nature et la puissance de l'agitation. Le principe actif peut être dissous soit dans le solvant organique, soit dans l'eau dans laquelle la solution organique est versée.

Les microsphères de l'invention peuvent être utilisées selon les méthodes connues. En particulier, lorsque la substance active incorporée est un médicament, les microsphères peuvent être utilisées par voie orale, sous forme de poudres, de suspensions aqueuses ou de capsules. Lorsque les microsphères ont une taille suffisamment faible, par exemple inférieure à 150 μm , elles peuvent aussi être administrées par injection, selon les méthodes connues. En outre, des microsphères ne contenant éventuellement pas de substance active peuvent être injectées de façon à provoquer localement une embolisation du système de vascularisation des angiomes.

La substance active incorporée dans les microsphères est généralement une substance hydrophobe.

Parmi les substances hydrophobes qui peuvent être incorporées dans les hydrogels ou dans les microsphères de l'invention on citera notamment : des hormones, en particulier des hormones stéroïdes (par exemple progestérone, estradiol, norgestrel, noréthistérone, testostérone, hydrocortisone, prednisolone, dexaméthasone), d'autres hormones (par exemple prostaglandines, insuline, etc.), des antibiotiques ou des antiparasitaires (par exemple griséofulvine, érythromycine, quinazoline et ses dérivés) des agents anticancéreux (par exemple nitrosourées, fluorouracile, azathioprine, doxorubicine, bléomycine, cis-platine, mitomycine) des anesthésiques ou des sédatifs (par exemple tétracaïne, chlorpromazine, diazépam, méthadone, naltrexone), ou d'autres

principes actifs tels que la théophylline, la caféine, la quinidine, ou encore des peptides (notamment la vasopressine).

L'invention concerne également l'utilisation d'un hyaluronane modifié tel que défini précédemment, dans la préparation d'un médicament, dans la préparation d'un im-
5 plant, dans la préparation d'un hydrogel, dans la préparation de microsphères, dans la préparation d'une pièce de prothèse osseuse (par exemple pièce de comblement, plaque ou vis), comme support de culture cellulaire *in vitro*, comme agent de piégeage ou d'en-
capsulation d'une substance hydrophobe, d'une macromolécule hydrophile ou de cellules vivantes. L'invention concerne notamment l'utilisation d'un hyaluronane modifié, dans
10 laquelle :

- ledit hyaluronane modifié est sous forme d'hydrogel contenant une substance macromoléculaire hydrosoluble et/ou une substance hydrophobe et/ou des cellules vivantes ;
- ledit hyaluronane modifié est insoluble dans l'eau et se présente sous la
15 forme de nanosphères ou de microsphères contenant un produit actif ;
- ledit hyaluronane modifié est insoluble dans l'eau et est préparé, par exemple par moulage, sous la forme d'une pièce massive, destinée notamment à être utilisée comme substitut osseux.

20 Les exemples suivants illustrent l'invention.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 :

25 Le produit de départ est un hyaluronate de sodium commercialisé par ACROS Organics (France) sous la dénomination de Sodium Hyaluronate 85 %.

On dissout 1 g de ce produit dans 100 ml d'eau distillée. On met en contact la solution pendant 15 min avec 5 g de résine Dowex 50*8 échangeuse de cations, conditionnée en H⁺ à 2,5 méq/ g (stœchiométrie 1:6). Après filtration, la solution contenant la
30 forme acide du hyaluronane est neutralisée jusqu'à pH 7 par addition d'hydroxyde de tétrabutylammonium.

On obtient ainsi le hyaluronate de tétrabutylammonium (HA-TBA).

On dissout 1 g de HA-TBA dans 100 ml de DMSO. On ajoute 57 μ l de 1-bromododécane. Après 24 h d'agitation à température ambiante, on soumet le mélange à une dialyse contre de l'eau distillée pendant 1 jour, puis contre une solution de NaN_3 (1/2500) dans l'eau distillée pendant 6 jours, et enfin, une journée contre de l'eau distillée.

5 On soumet ensuite la solution à une lyophilisation.

On obtient ainsi un dérivé du hyaluronate de sodium dont environ 10 % des fonctions carboxyliques sont estérifiées par des chaînes alkyle en C_{12} .

Le produit obtenu, dissous à raison de 1,2 % en solution aqueuse 0,15 M de chlorure de sodium, possède une viscosité de 140 Pa.s (à gradient de cisaillement 10 $0,001 \text{ s}^{-1}$) et un module élastique de 20 Pa (à 0,3 rad/s). Une telle solution peut être lyophilisée.

La détermination du taux de fixation des chaînes alkyle est effectuée par dosage chromatographique en phase gazeuse : 100 mg du produit à analyser sont traités pendant 4 h en milieu basique (NaOH 0,08 N) à température ambiante de manière à hydrolyser les fonctions ester reliant les chaînes alkyle au squelette polysaccharidique, et 15 permettre la libération de l'alcool correspondant ; on ajoute à ce mélange du toluène et un étalon interne (tétradécanol).

Après agitation au Vortex puis centrifugation à 3 000 x g pendant 20 min, on prélève la phase organique contenant l'alcool extrait et l'étalon interne, et on analyse 20 cette phase organique par chromatographie en phase gazeuse (Chromatographe SHIMADZU GC mini 3, colonne 10 % SE30, $T_{\text{inj}} = 280^\circ\text{C}$, $T_{\text{col}} = 210^\circ\text{C}$; détection par ionisation de flamme).

EXEMPLE 2 :

25 De façon analogue à celle décrite à l'exemple 1, en remplaçant les 57 μ l de 1-bromododécane par 36 μ l de 1-bromooctadécane, on obtient un dérivé du hyaluronate de sodium dont environ 4 % des fonctions carboxyliques sont estérifiées par des chaînes alkyle en C_{18} .

Le produit obtenu, en solution à 0,7 % dans une solution aqueuse 0,15 M de chlorure de sodium, possède une viscosité de 5 000 Pa.s (à gradient de cisaillement 30 $0,001 \text{ s}^{-1}$) et un module élastique de 15 Pa (à 0,3 rad/s).

La solution obtenue peut être lyophilisée.

EXEMPLE 3 :

On dissout 1 g de HA-TBA dans 100 ml de DMSO. On ajoute 3 μ l de di-tosylate de tétraéthylèneglycol. Après 24 h d'agitation à température ambiante, on ajoute 28 μ l de bromododécane. On agite à température ambiante pendant 24 h puis on lyophilise.

On obtient ainsi un dérivé du hyaluronate de sodium dont environ 5% des fonctions carboxyliques sont estérifiées par des chaînes en C_{12} et dont environ 1% des fonctions carboxyliques sont réticulées par des ponts tétraéthylèneglycol.

10 EXEMPLE 4 :

De façon analogue à celle décrite à l'exemple 1, on a préparé un hyaluronane modifié dans lequel environ 5 % des groupes carboxyliques sont estérifiés par des chaînes alkyle en C_{12} .

15 EXEMPLE 5 :

De façon analogue à celle décrite à l'exemple 1, on a préparé un hyaluronane modifié dans lequel 1 % environ des groupes carboxyliques sont estérifiés par des chaînes alkyle en C_{18} .

20 EXEMPLE 6 :

On opère comme à l'exemple 2, en remplaçant les 36 μ l de 1-bromooctadécane par 120 μ l de ce produit bromé. Le hyaluronane modifié obtenu précipite au cours de la dialyse et est isolé par filtration.

Avec le produit obtenu, on peut préparer des pièces massives, des films ou des microsphères, de façon usuelle.

EXEMPLE 7 : Etude des propriétés biologiques**(a) Etude de cytotoxicité et de biocompatibilité *in vitro***

Des essais de culture de chondrocytes en monocouche ont montré que les dérivés du hyaluronate de sodium ne sont pas cytotoxiques et sont biocompatibles. La cytotoxicité a été évaluée par l'étude de la libération dans le milieu de culture de chromate de sodium marqué au ^{51}Cr , ce chromate ayant été préalablement incorporé dans le

cytoplasme des chondrocytes. L'évaluation de la prolifération cellulaire a été effectuée par comptage des cellules, et la viabilité des cellules a été étudiée par coloration au bleu trypan qui colore les cellules mortes.

Une autre expérience a porté sur des cultures tridimensionnelles de chondrocytes de tête fémorales de rats Wistar mâles. La culture est effectuée sur billes d'alginate de calcium, en présence de hyaluronate de sodium ou en présence de dérivés selon l'invention ; les proportions hyaluronate (modifié ou non)/alginate étaient 1:5. Le milieu de culture était un milieu DMEM complet contenant de la thymidine tritiée et du sulfate de sodium marqué au ^{35}S . On a évalué l'activité de synthèse des chondrocytes par l'étude de l'incorporation de ^{35}S (signal correspondant à un cycle d'activité de synthèse de protéoglycanes) et par l'étude de l'incorporation de tritium (signal qui caractérise l'ensemble des cellules vivantes présentes dans la culture).

Le rapport de ces deux signaux illustre la proportion de cellules vivantes en cycle de synthèse des protéoglycanes. Au bout de 21 jours de culture, ce rapport est de l'ordre de 1,2 à 1,4 en présence, comme additifs, des composés des exemples 1 et 2, respectivement. Ce rapport est inférieur à 1 pour les cultures effectuées en présence de hyaluronate de sodium comme additif. Ce rapport est de l'ordre de 0,6 pour les cultures effectuées sans ces additifs.

On sait qu'en culture, les cellules susceptibles d'élaborer la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs peuvent être en phase de prolifération ou en phase de synthèse des protéoglycanes, l'une des deux phases étant toujours privilégiée par rapport à l'autre.

Avec les hyaluronanes modifiés de l'invention, on a en outre constaté, par l'étude du rapport thymidine tritiée/ADN total, que les cellules prolifèrent peu, contrairement aux cellules cultivées en l'absence de hyaluronate, et contrairement aux cellules cultivées en présence de hyaluronate qui prolifèrent encore davantage.

Cela montre que, de façon surprenante, les hyaluronanes modifiés de l'invention favorisent les phases de synthèse des protéoglycanes plutôt que les phases de prolifération, ce qui est très favorable à l'élaboration d'une matrice extracellulaire par les cellules ainsi cultivées.

(b) Implantation de gels de hyaluronane modifié selon l'invention

Ces essais ont été effectués chez le rat dans un modèle de lésions ostéochondrales décrit par Moskalewski *et al.*, Cell Transplant., 2, 467 (1993). Des lots de 6 rats ont été utilisés pour chaque mesure et pour chaque durée d'étude. Trois durées d'études ont été prises en considération (J10, J20 et J40). Sur chaque rat, seul le genou gauche a reçu l'implantation d'hydrogel au niveau de la lésion, le genou droit servant de témoin.

Les produits étudiés étaient ceux des exemples 1 et 2 ci-dessus.

Pendant les 10 premiers jours, les animaux étaient porteurs d'un émetteur permettant d'évaluer un indice de mobilité ainsi que les variations de température corporelle : on n'a constaté aucune réaction inflammatoire lorsque les lésions sont comblées par un hydrogel, ce qui met bien en lumière les propriétés de biotolérance vis-à-vis du matériau.

L'analyse macroscopique de la réparation du tissu lésé est effectuée notamment selon les critères suivants :

- régularité de la surface de l'implant,
- aspect du raccordement,
- coloration du cartilage périphérique,
- aspect du cartilage périphérique.

L'étude macroscopique a montré que, dans le cas de comblement par les hydrogels étudiés, le tissu de réparation est de type hyalin, c'est-à-dire qu'il présente un bon resurfaçage, et que sa coloration est proche de celle du tissu environnant. En outre, on observe une bonne intégration au niveau des bords de la lésion. Enfin, le dosage des constituants de la matrice et le dosage d'ADN mettent en évidence que les implants ont permis une bonne réhabilitation cellulaire et que le tissu de réparation, non fibreux, a une nature très proche de celle du cartilage.

REVENDICATIONS

1. Composition contenant un hyaluronane modifié constitué essentiellement d'acide hyaluronique, éventuellement sous forme salifiée, dans lequel une proportion non supérieure à 50 % des groupes carboxyliques sont sous forme d'esters aliphatiques ou
5 arylaliphatiques dont le groupe aliphatique ou arylaliphatique comporte au moins 10 atomes de carbone.

2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle ledit hyaluronane modifié est en outre réticulé.

3. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans
10 laquelle ladite proportion de groupes carboxyliques estérifiés est suffisamment faible et/ou la réticulation est effectuée à un taux suffisamment faible pour que ledit hyaluronane modifié soit soluble dans une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M.

4. Composition selon la revendication 3, dans laquelle ledit acide hyaluronane est réticulé.

15 5. Composition selon la revendication 4, dans laquelle le taux de réticulation est suffisamment faible pour que ledit hyaluronane modifié puisse former un hydrogel capable de retenir une masse d'eau au moins égale à 50 % de la masse du polymère.

6. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle ledit hyaluronane modifié est sous la forme d'un hydrogel aqueux contenant
20 éventuellement une substance hydrophobe et/ou une macromolécule hydrophile.

7. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, sous la forme d'un lyophilisat.

8. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, sous la forme d'un hydrogel contenant des cellules vivantes et/ou au moins un facteur de croissance.
25

9. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 et 3, dans laquelle ladite proportion de groupes carboxyliques estérifiés est suffisamment élevée pour que ledit hyaluronane modifié soit insoluble dans une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M.

10. Composition selon la revendication précédente, dans laquelle ladite proportion de groupes carboxyliques estérifiés est suffisamment faible pour que ledit hyaluronane modifié gonfle dans l'eau en formant un hydrogel.

5 11. Composition selon la revendication 9 ou 10, présentée sous la forme d'une pièce massive, de microsphères, d'un hydrogel ou d'un hydrogel lyophilisé.

12. Utilisation d'un hyaluronane modifié tel que défini dans l'une quelconque des revendications précédentes, dans la préparation d'un médicament, dans la préparation d'un implant, dans la préparation d'un hydrogel, dans la préparation de microsphères, dans la préparation d'une pièce de prothèse osseuse, comme support de culture cellulaire
10 *in vitro*, comme agent de piégeage ou d'encapsulation d'une substance hydrophobe, d'une macromolécule hydrophile ou de cellules vivantes.

13. Utilisation selon la revendication 12, dans laquelle :

15 – ledit hyaluronane modifié est sous forme d'hydrogel contenant une substance macromoléculaire hydrosoluble et/ou une substance hydrophobe et/ou des cellules vivantes ;

– ledit hyaluronane modifié est insoluble dans l'eau et se présente sous la forme de nanosphères ou de microsphères contenant un produit actif ;

– ledit hyaluronane modifié est insoluble dans l'eau et est préparé sous la forme d'une pièce massive destinée à être utilisée comme substitut osseux.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.